

令和 7 年 6 月 8 日現在

機関番号：15301

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2023～2024

課題番号：23K19469

研究課題名(和文)ミトコンドリアによる末梢CD4 CD8 double negative T細胞機能制御機構の解明

研究課題名(英文)Mitochondria regulates peripheral CD4 CD8 double negative T cells function

研究代表者

清家 圭介 (Seike, Keisuke)

岡山大学・大学病院・助教

研究者番号：20976427

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,200,000円

研究成果の概要(和文)：まずは造血幹細胞移植モデルマウスを用いて、DN-T細胞の動態を解析した。GVHDを起こさないSyngeneicとGVHDを起こすallogeneicモデルを用いて、脾臓におけるDN-T cellの細胞数を比較した。Day7ではallogeneic群で有意にDN-T細胞の割合と絶対数がsyngeneic群と比較し有意に増加した。このことからDN-T細胞は急性GVHDの病態に関連することが示唆された。次にCRISPR-Cas9レンチウイルスベクターを用いて電子伝達系複合体IIをノックアウトしたT細胞作成を行ったが、ノックアウト導入効率が悪く、現在SDHA KOマウスを作成中である。

研究成果の学術的意義や社会的意義

DN-T細胞は(1)少数ではあるが末梢血に存在、(2)抗腫瘍性、免疫抑制性、炎症誘発性など多くの機能を有する、(3)腫瘍選択的細胞障害効果、(4)GVHD抑制効果が判明している。DN-T細胞の機能制御機構を解明することにより、DN-T細胞の抗腫瘍効果を増強する方法に繋がり、造血幹細胞移植およびCAR-T細胞療法の有効性を向上させることができる。

研究成果の概要(英文)：First, we analyzed the dynamics of DN-T cells using a hematopoietic stem cell transplantation model mouse. We compared the number of DN-T cells in the spleen using a syngeneic model that does not cause GVHD and an allogeneic model that does cause GVHD. On day 7 after transplant, the percentage and absolute number of DN-T cells were significantly increased in the allogeneic group compared to the syngeneic group. This result suggests that DN-T cells are related to the pathology of acute GVHD. Next, we created T cells with electron transport complex II knocked out using a CRISPR-Cas9 lentiviral vector, however, the efficiency of knockout introduction was poor. We are currently creating SDHA KO mice.

研究分野：Immunology

キーワード：DN-T cell HSCT GVHD

様式 C - 19、F - 19 - 1 (共通)

1. 研究開始当初の背景

造血幹細胞移植は、血液悪性腫瘍の根治を目指す上で、今なお重要な治療選択肢である。一方で、GVHD は移植後の主な合併症であり、難治性の GVHD は非再発死亡の原因となる。GVHD 治療の基本は免疫抑制であるが、ドナー免疫細胞による GVT も抑制してしまうため再発のリスクが上昇する。そのため GVHD を抑制しつつ、GVT 効果を増幅させる移植方法の開発が喫緊の課題となっている。T 細胞は造血幹細胞移植において GVHD、GVT どちらにも深く関わっており、GVHD を抑制しつつ GVT を高めるためには T 細胞の機能制御が重要である。

T 細胞の機能は遺伝子発現だけでなく、ミトコンドリア代謝が大きく関わっており、それぞれの T 細胞サブセットは独自の代謝的な特徴を有している。ミトコンドリア電子伝達系複合体 I はヘルパー T 細胞の増殖やエピジェネティックな変化を促進、複合体 II はヘルパー T 細胞の増殖を抑制するが、サイトカイン産生を促進、そして複合体 III は制御性 T 細胞の機能を抑制することが報告されている。

DN-T 細胞は、末梢 T 細胞中に 5%ほど存在する比較的少数のサブセットであるが、in vitro で急性骨髄性白血病細胞に対して抗腫瘍効果を発揮するが、正常な細胞は障害しないと報告されている (Lee, JB. Clin Can Res 2018)。急性骨髄性白血病再発の 12 症例に対して DN-T 細胞を移植すると高い効果を認めた (Tang, B. American J Hematol 2022)。また、DN-T 細胞にがん細胞表面に発現する抗原を認識できるように遺伝子操作を加えた CAR (キメラ抗原受容体) 遺伝子導入 T 細胞は、GVHD が少なく、また高い抗腫瘍効果を有することが明らかとなり、今後の臨床応用が期待されている (Vasic, D. Sci Immunol 2022.)。一方、DN-T 細胞は、免疫抑制性、抗腫瘍性、炎症誘発性など様々な機能を有しており、その機能がどのように制御されているか不明である。

2. 研究の目的

これまでの知見により、DN T 細胞は (1) 少数ではあるが末梢血に存在、(2) 抗腫瘍性、免疫抑制性、炎症誘発性など多くの機能を有する、(3) 腫瘍選択的細胞障害効果、(4) GVHD 抑制効果が判明している。申請者はミシガン大学留学中に、ミトコンドリア電子伝達系複合体 II KO マウス T 細胞にて、刺激後に DN-T 細胞が増加することを発見した。この結果より、ミトコンドリア代謝が DN-T 細胞のこれら機能を制御しているという仮説のもと、DN-T 細胞機能におけるミトコンドリア電子伝達系複合体 I から III それぞれの重要性を明らかにすることを目的とする。

申請者はこれまで、造血幹細胞移植における免疫細胞と GVHD 標的臓器、また GVT 効果に対する研究を行ってきた。ミトコンドリアによる GVHD 標的細胞と免疫細胞の機能制御機構を解明し、現在もミトコンドリア機能を調整することにより、GVHD の治療や、抗腫瘍効果の増強を目指す研究を継続している。T 細胞の遺伝子発現に注目する研究は盛んに行われているが、代謝経路に着目している研究は少なく、特に DN-T 細胞に対する本分野における研究は少数であり、高い独自性を有する。 DN-T 細胞の機能制御機構を解明することにより、DN-T 細胞の抗腫瘍効果を増強する方法に繋がり、造血幹細胞移植および CAR-T 細胞療法の有効性を向上させることができる。

3. 研究の方法

DN-T 細胞におけるミトコンドリア電子伝達系複合体の機能について明らかにする。複合体 I から III までをそれぞれ特異的にノックアウト (KO) し、DN-T 細胞の機能がどのように変化するかをまずは検討する。複合体 KO DN-T 細胞を in vitro で刺激をし、増殖能、サイトカイン産生やエネルギー産生能を解析する。in vivo では、主に GVHD への影響と抗腫瘍効果を解析する (図 1)。

(1) ミトコンドリア電子伝達系複合体 I III KO DN-T 細胞の機能解析

複合体 I III の KO DN T 細胞を作成: 電子伝達系複合体 I III それぞれに対する CRISPR-Cas9 レンチウイルスベクターを用いて、複合体 I III の KO DN-T 細胞を作成する。

増殖能: CD3/CD28 を用いて TCR 刺激を行った細胞を CFSE による解析を行う。

機能解析: フローサイトメーターを用いて細胞内染色を行なった複合体 KO DN-T 細胞のサイトカイン産生能 (IFN、TNF、IL4、IL10、IL17、TGF) や細胞障害性のマーカー (Granzyme A、Granzyme B、Perforin) を解析する。

エネルギー産生能: 細胞外フラックスアナライザーを用いて、酸素消費量 (ミトコンドリアでのエネルギー産生) 及び細胞外酸性化速度 (酸素を用いない非ミトコンドリアエネルギー産生) を測定することによって、複合体 KO DN-T 細胞の代謝的特徴を解析する。

(2)複合体 I III KO DN-T 細胞の in vitro における抗腫瘍効果を解析

上記で作成した KO DN-T 細胞を腫瘍抗原で刺激を行った後、腫瘍細胞と共培養し、腫瘍細胞の死細胞率を解析する。腫瘍細胞はあらかじめ蛍光色素で染色し、フローサイトメーターにて死細胞を特定する。in vitro での腫瘍細胞に対する抗腫瘍効果を明らかにする。

(3)造血幹細胞移植モデルマウスにおける複合体 I III KO DN-T 細胞機能の検討

DN-T 細胞には免疫抑制性、抗腫瘍性、炎症誘発性などの様々な機能を有する。同種複合体 KO DN-T 細胞を用いて造血幹細胞移植を行い、WT DN-T 細胞を移植した群と比較し、GVHD の重症度を比較する。GVHD の重症度を比較することで、各複合体 KO DN-T 細胞の in vivo での機能変化を確認する。また同種造血幹細胞移植時に、複合体 KO DN-T 細胞とルシフェラーゼ発現腫瘍を同時に輸注し、移植後の腫瘍量を経時的に IVIS imaging system を用いて定量化することで in vivo での抗腫瘍効果を確認する。

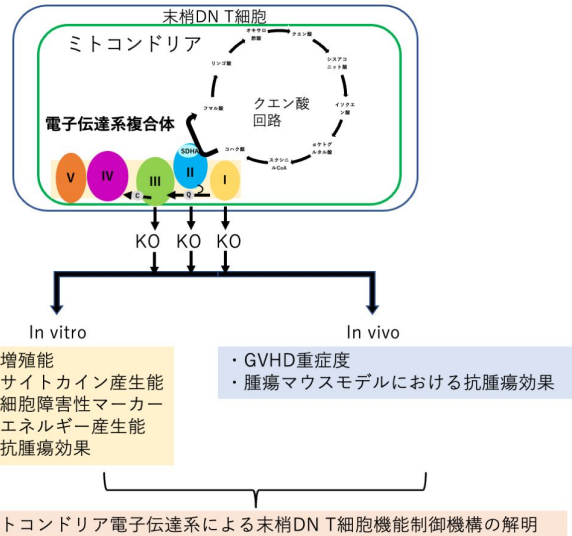


図 1. 電子伝達系複合体 KO DN-T 細胞の機能解析

4. 研究成果

(1)造血幹細胞移植モデルマウスにおける DN-T 細胞機能

造血幹細胞移植後の DN-T 細胞の動態、働きについてほとんど報告がなく、造血幹細胞移植モデルマウスを用いて、DN-T 細胞の動態を解析した。GVHD を起こさない syngeneic と GVHD を起こす allogeneic モデルを用いて、移植後 day7 と day14 の脾臓における DN-T cell の細胞数を比較した (図 2A, B)。Day7 では allogeneic 群で有意に DN-T 細胞の割合と絶対数が syngeneic 群と比較し有意に増加した (図 2C)。しかし、day14 には細胞数の差は消失した。このことから DN-T 細胞は急性 GVHD の病態に関連することが示唆された (図 2C)。今後、day7 において増加した DN-T 細胞のサイトカインを解析し、機能を解析する。

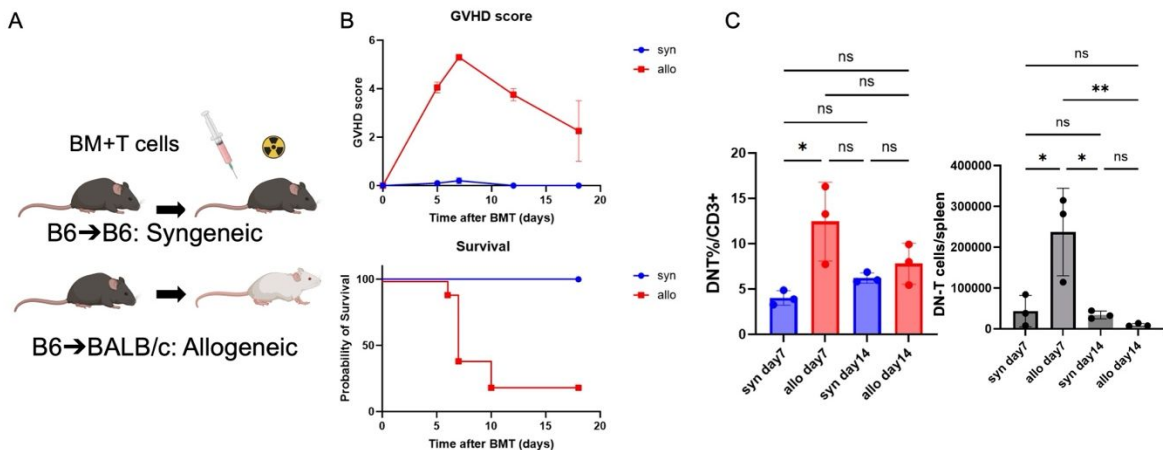


図 2. 造血幹細胞移植後 DN-T 細胞の動態

(2) ミトコンドリア電子伝達系複合体 I III KO DN-T 細胞の機能解析

CRISPR-Cas9 レンチウイルスベクターを用いてミトコンドリア電子伝達系複合体 II KO T 細胞の作成に成功はしたが、実験に必要な細胞数を得るには大量のウイルスベクターが必要であり、継続は難しいと判断した (図 3)。今後、ミトコンドリア電子伝達系複合体阻害剤、ミトコンドリア電子伝達系複合体 II KO マウスを使用して研究を継続予定である。

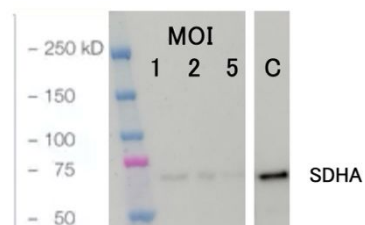


図 3. 電子伝達系複合体 II KO T 細胞の作成

CRISPR-Cas9 レンチウイルスベクターを用いて SDHA KO T cell を作成した。MOI, multiplicity of Infection; C, control

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

| | 氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号) | 所属研究機関・部局・職 (機関番号) | 備考 |
|--|---------------------------|-----------------------|----|
|--|---------------------------|-----------------------|----|

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

| 共同研究相手国 | 相手方研究機関 |
|---------|---------|
|---------|---------|